

07360163

METHOD OF DETECTING DIOXINS

PUB. NO.: 2002-228660 [JP 2002228660 A]

PUBLISHED: August 14, 2002 (20020814)

INVENTOR(s): MIZUKAMI HARUKI

NISHI KAZUTO

OKUYAMA AKIRA

APPLICANT(s): ENBIOTEC LABORATORIES KK

APPL. NO.: 2001-028434 [JP 200128434]

FILED: February 05, 2001 (20010205)

INTL CLASS: G01N-033/53; G01N-033/00

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of detecting dioxins, in which an antibody with respect to the dioxins, capable of detecting the dioxins at an isomer level is used even when the antibody is a nonspecific antibody with respect to the dioxins.

SOLUTION: In the method of detecting the dioxins, the dioxins in a specimen are detected in such a way that two or more kinds of antibodies which display different cross reactivities with respect to a plurality of kinds of dioxins isomers are reacted with the specimen, that the reaction or the nonreaction or the reaction intensity with respect to the specimen of the respective antibodies is related to the existence of the dioxins isomers, and that the dioxins in the specimen are detected at the isomer level.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-228660
(P2002-228660A)

(43) 公開日 平成14年8月14日 (2002.8.14)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S
/ G 0 1 N 33/00		33/00	D

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-28434 (P2001-28434)

(22) 出願日 平成13年2月5日 (2001.2.5)

(71) 出願人 399051401

株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ

東京都江東区青海2丁目45番地

(72) 発明者 水上 春樹

東京都江東区青海2丁目45番地 株式会社
エンバイオテック・ラボラトリーズ内

(72) 発明者 西 和人

東京都江東区青海2丁目45番地 株式会社
エンバイオテック・ラボラトリーズ内

(74) 代理人 100103160

弁理士 志村 光春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシン類の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 ダイオキシン類に対する非特異的な抗体であっても、ダイオキシン類を異性体レベルで検出可能な、ダイオキシン類に対する抗体を用いるダイオキシン類の検出手段を提供すること。

【解決手段】 被検物に対して、複数種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体を反応させて、各々の抗体の被検物に対する反応若しくは非反応、または、反応強度を、ダイオキシン類異性体の存在と関連付けて、被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出する。ダイオキシン類の検出方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【請求項1】 被検物に対して、複数種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体を反応させて、各々の抗体の被検物に対する反応若しくは非反応、または、反応強度を、ダイオキシン類異性体の存在と関連付けて、被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出する、ダイオキシン類の検出方法。

【請求項3】 複数の種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体が基板上に固定されている検出基板において、該検物と検出基板の抗体を接触させて、これらの抗体の検出サンプルに対する反応パターンと、このパターンに対応するダイオキシン類の異性体を関連付けることにより、該検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出する、請求項1または2記載のダイオキシン類の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】本発明は、ダイオキシン類の抽出手段に関する発明である。

【従来の技術】近年、ダイオキシン類による環境汚染が深刻化し、人体および生体への影響が懸念されている。これまで、ダイオキシン類の検出方法としては、ガス・クロマトグラフ質量分析法（GC-MS法）を中心とした分析法が用いられてきた。GC-MS法は、公定分析法として用いられており、その感度、精度共に、非常に優れた方法であるが、特殊な装置を必要とするために分析コストが高く、分析の手順自体も煩雑である等の問題点が認められる。

【発明が解決しようとする課題】このようなGC-MS法の欠点を解決するために、ダイオキシン類に対する抗体を用いたELISA法が開発されたが、ダイオキシン類に特有の性状から、通常のELISA法では解決されない問題点が認められる。

に特定することが困難になるからである。

【0005】通常のELISA法で、ダイオキシン類を異性体レベルで検出するには、異性体レベルで、交差反応性が認められない抗体を入手して用いることが必要であるが、このようなダイオキシン類の異性体レベルで特異性が認められる抗体を製造すること自体が、非常に困難を伴う作業である（特に、ダイオキシン類は、有害なもので、安全上の理由から、抗原を用いる抗体の製造作業自体が、可能な限り少ない方が好ましい）。

【0006】そこで、本発明が解決すべき課題は、ダイオキシン類に対する非特異的な抗体であっても、ダイオキシン類を異性体レベルで検出可能な、ダイオキシン類に対する抗体を用いるダイオキシン類の検出手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】本発明者は、この課題の解決に向けて鋭意検討を行った。その結果、ダイオキシン類の異性体間において交差反応性が認められる複数種類の抗体を、各々の抗体のダイオキシン類に対する反応性に関する特徴を組み合わせて検討することにより、特定のダイオキシン類の異性体に対して高度の特異性を有する抗体を得なくとも、容易にダイオキシン類を異性体レベルで検出することを見出した。

【0008】すなわち、本発明は、被検物に対して、複数種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体を反応させて、各々の抗体の被検物に対する反応若しくは非反応、または、反応強度を、ダイオキシン類異性体の存在と関連付けて、被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出する、ダイオキシン類の検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を説明する。本検出方法の検出の対象となるダイオキシン類は、特に限定されないが、典型的なものとして、ダイオキシン類特指措置法で指定されている29種類のダイオキシン類を挙げるができる。具体的には、2,3,7,8-T, CDD, 1,2,3,7,8-P; CDD, 1,2,3,4,7,8-H; CDD, 1,2,3,6,7,8-H, CDD, 1,2,3,7,8,9-H; CDD, 1,2,3,4,6,7,8-H, CDD, 1,2,3,4,6,7,8,9-O, CDD等のジベンゾダイオキシン類; 3,4,4',5'-T, CB, 3,3',4,4'-T, CB, 3,3',4,4',5-P; CB, 3,3',4,4',5,5'-H; CB, 2,3,3',4,4'-P; CB, 2,3,4,4',5-P; CB, 2,3',4,4',5-P, CB, 2',3,4,4',5-P; CB, 2,3,3',4,4',5-H; CB, 2,3,3',4,4',5'-H; CB, 2,3,3',4,4',5,5'-H; CB等のコプラナーPCB類; 2,3,7,8-T, CDF, 1,2,3,7,8-P; CDF, 2,3,4,7,8-P, CDF, 1,2,3,4,7,8-H; CDF, 1,2,3,6,7,8-H, CDF, 1,2,3,7,8,9-H; CDF, 2,3,4,6,7,8-H, CDF,

F. 1,2,3,4,5,6,7,8-H, CDF. 1,2,3,4,7,8,9-H, CDF. 1,2,3,4,5,7,8,9-O, CDF等のジベンゾフラン類等が挙げられる。

【0010】このようなダイオキシン類の異性体レベルにおける差異と汚染源との関係としては、例えば、都市廃棄物焼却施設により汚染された表層では、T, CDD, T, CDDおよびT, CDDが少なく、T, CDDおよびT, CDDが多い傾向が認められ、製材所の周辺（木材の防腐剤として使用されたPCBに含まれる不純物の痕跡パターンを反映している）では、T, CDDおよびT, CDDが少なく、T, CDD, T, CDDおよびT, CDDが多い傾向が認められ、紙・パルプ工場の廃液によって汚染された河川底泥中では、T, CDDの全体に占める割合が多い傾向が認められている。本検出方法によって、ダイオキシン類を異性体レベルで検出し、この検出内容とかかるダイオキシン類と汚染源との関係を関連付けて、本検出方法により、ダイオキシン類の汚染源を高い確率で特定することが可能となる。

【0011】被検物は、ダイオキシン類の検出の対象となり得るものであれば限定されず、例えば、大気、土壌、湖水や河水等の水試料等が挙げられる。被検物は、その性質に応じて、様々な前処理、例えば、希釈処理、遠心処理等を行って、これに本検出方法を適用することもできる。

【0012】本検出方法において用いる抗体は、検出の対象とするダイオキシン類を選んで、これを免疫抗原（必要に応じて、目的とするダイオキシン類とハプテンを結合させたものを免疫抗原とすることも可能である）として、畜法により製造して用いることができる。

【0013】すなわち、上記抗体がポリクローナル抗体の場合には、目的とするダイオキシン類を免疫抗原として免疫した動物に由来する免疫血清から製造することが可能であり、同じくモノクローナル抗体の場合には、ポリクローナル抗体と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これにより目的とするダイオキシン類を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

【0014】免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

【0015】免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～14日毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清又はモノクローナル抗体製造のため

の免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0016】モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/0-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-4, 5, 6, TG1, 7（以上、マウス由来）；210, RCY, Ag1, 2, 3（ラット由来）；SKO-007, GM15006TG-A12（以上、ヒト由来）等を用いることができる。

【0017】上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)）等に従って行うことができる。

【0018】より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

【0019】所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検出及び単一クローン化に供することができる。

【0020】目的とするモノクローナル抗体産生株の検出は、例えばELISA法、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクタブロー法、RIA法等の一般的な検出法に従って行うことができる。

【0021】このようにして得られるダイオキシン類を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体培地中で長時間保存することもできる。

【0022】このハイブリドーマからの目的とするモノクローナル抗体の採取は、ハイブリドーマを畜法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマを、このハイブリドーマに対して適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

【0023】このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

【0024】このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、目的とするダイオキシン

類に対して特異反応性を有する抗体であるが、異性体レベルまでの正確な特異反応性を追求すると、スクリーニングは容易ではない。本検出方法では、製造した抗体において、いくつかのダイオキシンの異性体間で交差反応性が認められても、このような抗体をいくつか組み合わせることにより、ダイオキシン類を異性体レベルで検出することが可能である。

【0025】すなわち、被検物に対して、複数種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体を反応させて、被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出することが可能である。

【0026】具体的に、このような検出を可能にする手段として、各々の抗体の被検物に対する反応若しくは非反応、または、反応強度を、ダイオキシン類異性体の存在と関連付けて、被検物のダイオキシン類を検出することが挙げられる。

【0027】例えば、抗体1が、ダイオキシン類1および2に対する反応性が認められ、抗体2が、ダイオキシン類2および3に対する反応性が認められる場合において、被検物が、抗体1および抗体2に対して陽性である場合には、被検物中のダイオキシン類は、ダイオキシン類2ということになる。

【0028】また、抗体1に、ダイオキシン類1に対して強い反応性が認められ、ダイオキシン類2および3に対しては弱い反応性のみが認められ、抗体2に、ダイオキシン類2に対して強い反応性が認められ、ダイオキシン類3に対しては弱い反応性のみが認められ、抗体3に、ダイオキシン類3に対して強い反応性が認められ、ダイオキシン1および2に対しては弱い反応性のみが認められる場合において、被検物が、抗体1および2に対する弱い反応性が認められ、抗体3に対する強い反応性が認められた場合には、被検物中のダイオキシン類は、ダイオキシン類3ということになる。

【0029】なお、上記のダイオキシン類に対する抗体の反応性は、当然、被検物中のダイオキシン類の濃度にも依存するので、相対的な反応性の比較により、被検物中のダイオキシン類の種類を特定することが可能であるのと共に、絶対的な反応性を検討することにより、被検物中のダイオキシン類の濃度も算出することが可能である。

【0030】このようにして、被検物に対して、複数種類のダイオキシン類異性体に異なる交差反応性を示す2種以上の抗体を反応させて、被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出することができる。なお、一般的に、ダイオキシン類を抗原とする抗体の、ダイオキシン類の異性体に対する反応性の差異は、あまり大きくない傾向が強いので、本検出方法において用いるダイオキシン類に対する抗体の反応性強度は、少なくとも2段階の基準とすることが好適である。本検出方法のさらに具体的な感度は、実施例の欄において記載する。

【0031】本検出方法における検出感度は、1. ダイオキシン類に対する抗体が固定化されている担体（抗体固定化担体）を用いる場合と、2. ダイオキシン類のハプテン抗原が固定化されている担体（抗原固定化担体）を用いる場合に大別され得る。

【0032】1. 抗体固定化担体としては、マイクロタイタープレート、抗体固定化検出基板、ポリスチレンチューブ等を挙げることができる。これらの抗体固定化担体の中でも、抗体固定化検出基板は、小型であり、なおかつ、一つの基板上で、様々な抗体の被検物に対する反応性を一覧することが可能であり、基板上の反応パターンを解析することで、容易に被検物のダイオキシン類を異性体レベルで検出することが可能であり、好適である。本検出方法において、抗体固定化担体を用いる場合には、まず、被検物を、酵素または蛍光物質等で標識したハプテンと競合反応させ、次に、ダイオキシン類に対する抗体に結合した標識ハプテンの量を酵素反応または蛍光反応等を利用して測定することにより、被検物のダイオキシン類に対する抗体への反応量を調べることができる。

【0033】ここで、上述した本検出方法を行うのに好適な抗体固定化検出基板について説明する。抗体固定化検出基板（以下、検出基板という）は、2種類以上の抗体が基板上に固定されている、検出基板であり、被検物と検出基板におけるダイオキシン類に対する抗体を接触させて、これらの抗体の被検物に対する反応パターンと、このパターンに対応するダイオキシン類を異性体レベルで関連付けることにより、被検物中のダイオキシン類を異性体レベルで検出することができる。

【0034】検出基板の素材は、特に限定されず、プラスチック類、ガラス類、金属類等を選択することが可能である。基板の大きさは、特に限定されないが、通常は、縦横数cm程度である。

【0035】検出基板における、基板への抗体の固定方法は、抗体がその物質の認識機能を失わずに、かつ、容易に基板から脱落し難い方法を選択することが好ましい。具体的には、i) 基板上に小孔を設けて、この小孔に抗体を配置する方法、ii) 基板上に抗体を非共有結合（疎水結合）で固定するか、基板上にアルデヒド基等の官能基を導入して、共有結合により抗体を固定する方法、iii) 基板上に抗体溶液をアレイヤー（基板上に溶液を分注する装置）を用いて、一定量（1～100nm程度）を、一定間隔（10～100μm程度）でスポットし、このスポットの後、基板上にBSA溶液等を加えることによりブロッキングして固定化する方法、iv) ガラスビーズに代表されるマイクロビーズ等の小担体に抗体を固定化して、これを、基板上に設けた小孔に配置して、基板における抗体の固定化を行う方法等が挙げられる。

【0036】また、特に、iv) のマイクロビーズ等の小

9

10

28

36

45

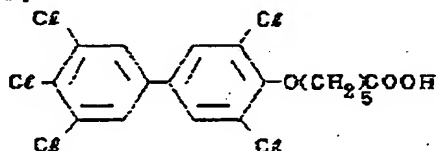
56

[0042]

【0043】(1) 抗体固定化ビーズの調製

【 〇 〇 4 4 】

【化1】



56

が固定化されたマイクロビーズを調製した。

【0046】(2) 検出基板の製造

ガラス製の基板(縦2cm×横2cm×厚さ0.5mm)上に、フォトリソ法により、多数の溝(150×150 μ m程度の大きさの、逆ピラミッド型の溝)を全面に設けて(約2000箇所/基板)、この基板面の2/3をセロファンテープで被覆して、残りの1/3の半面の溝に、上記の抗ダイオキシン抗体Aを嵌め込んで配置して、基板面の1/3に抗ダイオキシン抗体Aを固定化した。次いで、セロファンテープで被覆した2/3のテープを剥がし取って、この部分を半面ずつに分割して、半面をセロファンテープで被覆して、上記と同じ要領で、上記の抗ダイオキシン抗体B・Cを、かかる半面部分にそれぞれ固定化した。このようにして、基板面が、抗ダイオキシン抗体A・B・Cの固定面で3分割された、検出基板を製造した。

【0047】(3) このようにして得られた検出基板を、ダイオキシン(3,3',4,4',5-P₁CBおよび3,3',4,4',5,5'-H₆CB)とHRP標識ダイオキシンの混合溶液(0.0.5.1.5.50ppmの3,3',4,4',5-P₁CBお

19

* ppmのHRP標識ダイオキシン(3,3',4,4',5-P₁CBおよび3,3',4,4',5,5'-H₆CB)溶液と混合したもの)に浸漬して、室温で1時間放置した後、バッファーで洗浄して、基板を乾燥した。その後、それぞれのダイオキシンの稀薄水溶液に浸漬した基板を、比色基質(OPD: o-phenylene diamine 3mg/mL水溶液)中に、5分間浸漬して、異なる抗体を固定化したそれぞれの分割面から、無作為に1つずつ、マイクロビーズを固定化した溝を選択して、その比色強度を測定して、抗体A、B、Cのそれぞれに対する、上記のダイオキシン類の反応曲線を作成した(第1図: 3,3',4,4',5-P₁CBに対する反応曲線、第2図: 3,3',4,4',5,5'-H₆CBに対する反応曲線)。

【0048】次いで、得られた反応曲線を基に、それぞれのダイオキシン異性体濃度に対する阻害反応の強さを3段階(-: 20%未満の阻害率、+: 20~60%の阻害率、++: 60%を超える阻害率)に分類した(第1表(3,3',4,4',5-P₁CBに対する反応強度)および第2表(3,3',4,4',5,5'-H₆CBに対する反応強度))。

【0049】

【表1】

第1表

抗体A Co-PCB濃度 強度 μ g/ml	抗体B Co-PCB濃度 強度 μ g/ml	抗体C Co-PCB濃度 強度 μ g/ml
0~0.05 -	0~2 -	0~0.05 -
0.05~1 +	2~10 +	0.05~0.1 +
1< ++	10< ++	0.1~50 ++

【0050】

※ ※ 【表2】

第2表

抗体A Co-PCB濃度 強度 μ g/ml	抗体B Co-PCB濃度 強度 μ g/ml	抗体C Co-PCB濃度 強度 μ g/ml
<50 -	<50 -	0~0.05 -
		0.05~0.1 +
		0.1~50 ++

【0051】さらに、3種類の抗体の組み合わせ(例えば、抗体A: 抗体B: 抗体C = - : - : -, - : - : +, ...等)のそれぞれについて予想されるCo-PCB異性体の濃度範囲を、上記3段階の反応強度から推定し

た(第3表)。

【0052】

【表3】

第 3 表

抗体反应强度			理论值: $\mu\text{g/ml}$	
抗体A	抗体B	抗体C	3,3',4,4',5-P ₂ CB	3,3',4,4',5'-H ₂ CB
—	—	—	0 ~ 0.05	0 ~ 0.05
—	+	—	0 ~ 0.05	0.05 ~ 0.1
+	—	—	抗原无L	
—	+	+	抗原无L	
+	—	+	抗原无L	0 ~ 0.05
+	+	+	0.05 ~ 0.1	
+	—	+	抗原无L	
+	+	+	抗原无L	
—	—	++	0 ~ 0.05	0.1 ~ 50
—	+	++	抗原无L	
+	—	++	0.05 ~ 1	0 ~ 50
+	+	++	抗原无L	
—	++	++	抗原无L	
++	—	++	1 ~ 2	0 ~ 50
++	++	++	抗原无L	
++	+	++	2 ~ 10	0 ~ 50
++	++	++	10 ~ 50	0 ~ 50
—	++	+	抗原无L	
+	++	—	抗原无L	
++	++	—	抗原无L	
++	++	+	抗原无L	
++	+	—	抗原无L	
++	—	+	抗原无L	
++	+	+	抗原无L	

【0054】
【表4】

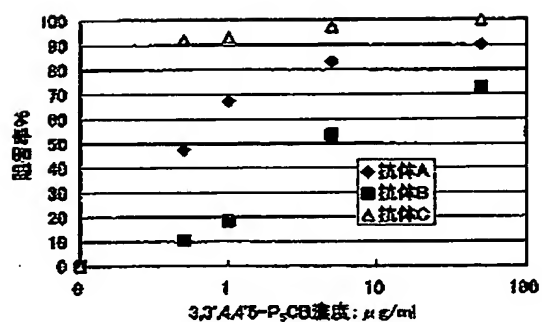
第 4 表

号	抗体反应强度			混合值: $\mu\text{g/ml}$		混合值: $\mu\text{g/ml}$	
	抗体A	抗体B	抗体C	3.3'4.4'5-P ₂ OB	3.3'4.4'5.5'-1 ₄ OB	3.3'4.4'5-P ₂ OB	3.3'4.4'5.5'-1 ₄ OB
1	++	-	++	1	0	1~2	0~50
2	-	-	++	0	1	0 ~ 0.05	0.1~50
3	+	-	++	0.5	0.5	0.05~1	0~50
4	++	-	++	1	1	1~2	0~50
5	++	+	++	5	1	2~10	0~50
6	++	-	++	1	5	1~2	0~50
7	++	+	++	5	6	2~10	0~50

【図2】3,3',4,4',5,5'-H₂CB に対して、検出基板を用いて得た検出線である。

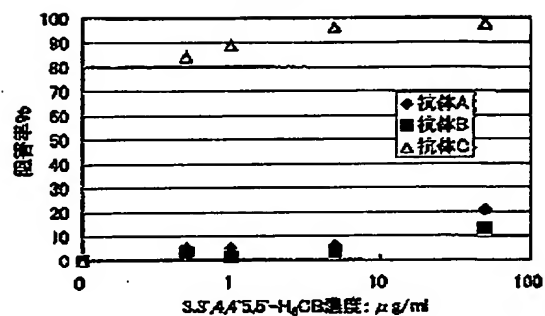
【図1】

第1図



【図2】

第2図



フロントページの続き

(72)発明者 奥山 亮

東京都江東区青沼2丁目45番地 株式会社
エンバイオテック・ラボラトリーズ内